

Invest Agrar: Sist Recur For (2004) 13(3), 539-549

Respuesta de acebuche y encina a la aplicación de una enmienda fúlvica en suelos contaminados por elementos traza

P. Madejón* y J. M. Murillo

*Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC).
Apdo. Correos 1052. 41080 Sevilla. España*

Resumen

En el presente trabajo se ha estudiado la acción de una enmienda orgánica, rica en ácidos fúlvicos, sobre la nutrición y crecimiento de dos especies representativas del bosque Mediterráneo, olivo silvestre (*Olea europaea* L. var. *Sylvestris* Brot.) y encina (*Quercus ilex* L. subesp. *ballota*). Ambas especies han sido muy utilizadas en las reforestaciones del corredor verde del Guadamar para la recuperación ecológica de los suelos afectados por el vertido minero de Aznalcóllar. Los ácidos fúlvicos aumentan la disponibilidad de elementos minoritarios; sin embargo, podrían resultar fitotóxicos si aumentan en exceso la disponibilidad de elementos traza potencialmente tóxicos. En suelos del corredor con una elevada contaminación residual por elementos traza, la adición de la enmienda sólo aumentó discretamente, la concentración de Cu, Zn, As, Cd, Pb y Tl en las hojas de ambas especies. Los contenidos de elementos básicos no fueron afectados básicamente (se llegaron a registrar aumentos significativos de N en el acebuche) y se obtuvieron aumentos de clorofila en ambas especies. La respuesta del acebuche a la enmienda fue excelente, siendo su crecimiento mayor en los suelos afectados que en un suelo no afectado utilizado como referencia. Los resultados parecen confirmar la ausencia de fitotoxicidad que podría haberse derivado de la aplicación de la enmienda en suelos contaminados por elementos traza.

Palabras clave: fitorremediación, reforestación, ácidos fúlvicos, nutrición vegetal, metales pesados, Guadamar.

Abstract

Wild olive and holm oak response to a fulvic amendment application on soils polluted by trace elements

The effect of the application of a fulvic acids-rich amendment on the growth and nutrition of two representative species of the Mediterranean forest, wild olive (*Olea europaea* L. var. *sylvestris* Brot.) and holm oak (*Quercus ilex*, L. subsp. *ballota*) was studied. Both species were used frequently in the afforestations of the «green corridor» in the Guadamar Valley, as part of the ecological restoration of the soils affected by the Aznalcóllar mine spill. Fulvic acids are known to increase the availability of the minor elements; however, phytotoxic effects could derive if the mobilization of trace elements potentially toxic are excessive. The application of the amendment in soils of the corridor highly polluted by trace elements, increased only slightly the concentrations of Cu, Zn, As, Cd, Pb and Tl in the leaves of both species. The main nutrient contents were basically not affected (significant increases in N were recorded for the wild olive) and increases in chlorophyll were recorded for both species. Interestingly, the growth of the wild olives treated with the amendment was better in the affected soils than in an unaffected soil used for comparison. The results seem to corroborate the absence of phytotoxicity that could derive from the amendment application on soils polluted by trace elements

Key words: phytoremediation, reforestation, fulvic acids, plant nutrition, heavy metals, Guadamar.

Introducción

La utilización de árboles para la recuperación de suelos contaminados es una práctica ampliamente difundida. Su capacidad depuradora ha sido utilizada combinando técnicas de fitorremediación con la reutilización de aguas residuales y otros residuos (por

ejemplo, lodos de depuradora), estrategia especialmente útil cuando se requieren grandes cantidades de agua y nutrientes. Esta estrategia se ha utilizado con éxito con árboles de rápido crecimiento (sauces, álamos, alisos, eucaliptos) en la denominada «short-rotation forestry (SRF)» (Wood Supply Research Group, 1997; Punshon, 2001).

Además de árboles de rápido crecimiento, útiles para fitorremediación, existen otros árboles que pueden ser muy útiles para técnicas más simples de fitoestabi-

* Autor para la correspondencia: pmadejon@irnase.csic.es
Recibido: 12-02-04; Aceptado: 01-10-04.

lización, que aprovechan su presencia física para mejorar la calidad del suelo y evitar la dispersión de contaminantes que puede ocasionar el agua o el viento (Punshon, 2001). En este sentido, la utilización de plantas autóctonas arbustivas, suplementadas con materia orgánica, suele ser la mejor estrategia para la recuperación de suelos erosionados, política recientemente recomendada por la UE (Cox *et al.*, 2001; Caravaca *et al.*, 2003).

Muchas especies representativas del bosque Mediterráneo, como el acebuche y la encina, son capaces de soportar las condiciones de sequía y altas temperaturas que caracterizan al clima semiárido del sur de España. El acebuche respondió muy bien al tratamiento combinado de compost urbano e inoculación con micorrizas bajo las condiciones indicadas (Caravaca *et al.*, 2003).

Ambas especies han sido utilizadas en las reforestaciones establecidas en el corredor verde del Guadiamar, creado tras el accidente minero de Aznalcóllar (abril de 1998), en que se vertieron más de 5 millones de m³ de residuos mineros a las cuencas de los ríos Agrio y Guadiamar (Grimalt *et al.*, 1999). Con este corredor se pretende conectar el área del Parque Nacional de Doñana con Sierra Morena (CMA, 2003).

Tras el accidente comenzó una ingente labor de limpieza y recuperación de suelos, que supuso la retirada de los lodos y la mejora posterior de la fertilidad de los suelos afectados, muy deteriorada tras las labores de limpieza (Arenas *et al.*, 2001; CMA, 2001; CMA, 2003). La aplicación de materia orgánica resultó esencial tanto para la recuperación de la fertilidad como para la fijación de los elementos traza que todavía quedaron en los suelos tras la limpieza (CMA, 2001).

Para tareas de esta magnitud es necesario disponer de materia orgánica de bajo coste, sobre todo cuando son necesarias aportaciones repetidas. La reutilización de determinados residuos y efluentes orgánicos podría resultar útil, sobre todo si, paralelamente, se contribuye a resolver el problema de su ubicación. Pero cuando se trata de zonas contaminadas por elementos traza, es importante conocer la naturaleza de la enmienda, puesto que en función de la misma, y de la dosis aplicada, podrían movilizarse algunos de estos elementos, potencialmente tóxicos, con resultados negativos para la vegetación.

Este sería el caso, por ejemplo, del alpechín que genera la industria aceitera, cuyo valor como fertilizante o enmienda ha sido resaltado por numerosos autores (Tomati y Galli, 1992; Martín-Olmedo *et al.*, 1995; Cabrera *et al.*, 1996). A partir del co-compostaje del alpechín con otros residuos se pueden generar productos líquidos, ricos en ácidos fúlvicos, con notable

capacidad fertilizante. También sería el caso de las vinazas que se generan en la industria azucarera, ricas en ácidos fúlvicos (Madejón, 1996), enmienda útil si la dosis es moderada (Murillo *et al.*, 1993). Los ácidos fúlvicos potencian el crecimiento de las plantas (Chen y Aviad, 1990), hasta el punto de que en la actualidad se comercializan numerosos fertilizantes en función de su riqueza en estos compuestos.

La acción positiva de los ácidos fúlvicos ha sido atribuida a efectos hormonales directos, derivados de su absorción radical por parte de las plantas. Sin embargo, la mayoría de los autores se inclinan más por una acción indirecta, derivada de la solubilización de determinados nutrientes básicos para la planta (Chen y Aviad, 1990; Clapp *et al.*, 2002). En este contexto, habría que tener en cuenta que la acción positiva de los ácidos fúlvicos sobre la disponibilidad de micronutrientes, podría trocarse en una acción negativa si, paralelamente, potenciasen la disponibilidad de elementos traza tóxicos para la planta (Chen y Aviad, 1990; Baldock y Nelson, 2000; Clapp *et al.*, 2002; Antunes *et al.*, 2002).

Por consiguiente, es importante conocer, bajo estas condiciones de contaminación, los efectos que podría tener sobre la vegetación la aplicación de residuos ricos en ácidos fúlvicos. Como indican Antunes *et al.* (2002), los mecanismos de formación de complejos entre los ácidos fúlvicos e iones metálicos son muy complejos y dependen de muchos factores, como pH, fuerza iónica del medio y concentración de ácidos fúlvicos.

En el presente trabajo se estudia la respuesta de dos especies representativas del bosque Mediterráneo (acebuche y encina), implantadas en las reforestaciones del corredor verde del Guadiamar, a dosis moderadas de una enmienda líquida, rica en ácidos fúlvicos, aplicada en suelos con un nivel alto de contaminación por elementos traza.

Material y Métodos

Parcelas experimentales. Selección de plantas

El estudio se realizó en cinco zonas del corredor verde del Guadiamar, todas pertenecientes al término municipal de Sanlúcar la Mayor (provincia de Sevilla). La primera, aguas arriba de la confluencia de los ríos Agrio y Guadiamar, no fue afectada por el vertido, y puede ser considerada como zona control (suelo 1: 37°, 29', 55" N - 6°, 13', 17" O). En esta zona fueron seleccionados 10 plantones de acebuche y otros 10 de encina.

Las zonas restantes, más al sur, sí fueron afectadas por el vertido, presentando todas ellas un nivel más o menos acusado de contaminación residual por elementos traza. En dos de ellas (suelo 2, 37° 25' 43" N - 6°, 12', 58" O, y suelo 3, 37° 23' 13" N - 6° 13' 36" O) fueron seleccionados 10 plantones de acebuche y en las otras dos (suelo 4, 37° 28' 48" N - 6°, 12', 43" O, y suelo 5, 37° 28' 9" N - 6°, 12', 42" O) 10 plantones de encina. Las características generales del suelo de cada zona se recogen en la Tabla 1.

Las reforestaciones estudiadas se habían realizado con plantas de un año (una savia). Las reforestaciones implantadas en los suelos 1, 2, 4 y 5 tenían dos años en el momento de realizar este estudio (esto es, plantas con tres años de edad). La reforestación del suelo 3 tenía 4 años (plantas de cinco años).

Los plantones seleccionados en cada suelo, razonablemente homogéneos en aspecto y altura, fueron distribuidos en dos lotes, destinándose cinco de ellos para su tratamiento con la enmienda líquida y los cinco restantes para ser regados con agua. Para diferenciarlos, se utilizaron cintas aislantes de diferente color, colocadas alrededor del tronco, a una altura de 2 cm del suelo.

Medidas de campo. Tratamientos aplicados

Una semana antes de comenzar los tratamientos (riego con la enmienda y con agua) se midió la altura, el diámetro del tronco (mediante un calibre digital) y la longitud de tres ramas de cada planta, marcadas en su base mediante cintas aislantes de diferente color. Estas medidas fueron repetidas 20 días después de haber finalizado los riegos, para comprobar el incremento

ocasionado por los tratamientos (enmienda y agua) sobre cada uno de estos parámetros.

Los tratamientos aplicados consistieron en 6 riegos localizados a cada plantón con un volumen de 250 ml de la enmienda líquida o de agua de la red, de forma que todas las plantas recibieran un volumen total de 1.500 ml. La enmienda líquida se diluyó cinco veces con agua, siguiendo las indicaciones del proveedor (50/250 v/v). Cada planta recibió así un volumen de 300 ml de enmienda pura. El primer riego se efectuó el 3 de febrero de 2003 y el último el 2 de julio del mismo año. La enmienda procedía del co-compostaje de lodos de alpechín con otros residuos agrícolas, proceso que, en teoría, garantiza una madurez suficiente, importante para mantener la calidad de los suelos (Plaza *et al.*, 2003). La Tabla 2 recoge las principales características de la enmienda aplicada.

Finalizados los riegos (20 días después), se recolectaron hojas de cada planta (hojas del año anterior) para su análisis químico y se midió su contenido de clorofila, directamente en campo, mediante un medidor portátil SPAD-505 (medidas no destructivas). Para ello, se escogieron al azar tres hojas por planta, que fueron cuidadosamente limpiadas de polvo, realizándose varias medidas por hoja para obtener un valor medio en cada una de ellas.

Análisis de laboratorio

Una vez en el laboratorio, las muestras vegetales fueron descontaminadas mediante breves lavados con agua desionizada, secadas en estufa de aire forzado a 70° C y molidas para su tratamiento y análisis. Las muestras fueron digeridas por vía húmeda, con HNO₃

Tabla 1. Análisis de los suelos seleccionados para el estudio del acebuche (1, 2 y 3) y encina (1, 4 y 5) (profundidad de 0-25 cm). Se indican las características generales de los suelos afectados del corredor verde del Guadiamar (media \pm error estándar e intervalo; 0-25 cm).

Suelos	pH	CaCO ₃ (%)	N (%)	P (mg kg ⁻¹)	K (mg kg ⁻¹)	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)
1 (control)	5,4	0,2	0,11	15	39	55	35	10
2 (afectado)	3,7	0,2	0,08	6	20	61	28	11
3 (afectado)	3,7	0,3	0,11	11	41	58	34	7
4 (afectado)	7,1	0,4	0,08	20	59	51	39	10
5 (afectado)	6,8	0,2	0,07	26	22	43	36	20
<i>Características generales de los suelos del corredor verde (N = 30)</i>								
Media	7,2 \pm 0,2	6,2 \pm 1,0	0,1 \pm 0,006	17,3 \pm 2,4	186 \pm 23	39,7 \pm 2,4	40,0 \pm 1,1	20,6 \pm 1,6
Intervalo	3,7-8,4	0,2-17,7	0,05-0,22	3,9-51,4	20-492	11,7-65,3	27,6-51,9	6,3-42,1

Tabla 2. Análisis de la enmienda orgánica

pH	4,5
Materia seca (% p/p)	20
Materia orgánica (% p/p)	35
Extracto húmico (% p/p)(1)	30
Ácidos húmicos (% p/p) (1)	1
Ácidos fúlvicos (% p/p) (1)	29
N-Kjeldhal (% p/p)	2
P (% p/p)	0,15
K (% p/p)	3
Ca (% p/p)	0,20
Cu (mg kg ⁻¹)	210
Zn (mg kg ⁻¹)	80
As (mg kg ⁻¹)	Trazas
Cd (mg kg ⁻¹)	Trazas

(1) Determinación realizada según los Métodos oficiales del Ministerio de Agricultura (1986).

concentrado bajo presión, en horno microondas, diluyéndose posteriormente el extracto líquido obtenido con agua desionizada para el análisis de macronutrientes por ICP-OES (espectrometría óptica con plasma acoplado inductivamente) y elementos traza por ICP-MS (espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente). En el presente trabajo se estudiaron los resultados para As, Cd, Cu, Pb, Tl y Zn. Paralelamente, se analizaron tres muestras de referencia (Colinet *et al.*, 1982; Griepink y Muntau, 1987, 1988) mediante ICP-MS para contrastar la exactitud de la metodología empleada (Tabla 3).

Las muestras de suelo se secaron en estufa a 50° C. Posteriormente fueron molidas y tamizadas (tamaño de partícula <2mm). Una parte de cada muestra se molió en mortero de ágata (tamaño de partícula <60 µm) para el análisis de elementos traza. En las muestras con menor tamaño de partícula (<60 µm) se determinó la concentración de S, As, Cd, Cu, Pb y Zn extraídos con *aqua regia* bajo presión en horno microondas. En las de mayor tamaño (<2mm), además de los análisis de rutina (Tabla 1), se determinó la concentración de Cu, Pb y Zn extraíbles con una solución 0,05 M de EDTA. Todas las determinaciones de suelo se realizaron mediante ICP-OES.

Los índices de carga contaminante de los suelos que fueron afectados por el vertido (valores PLI) fueron calculados de acuerdo con Tomlinson *et al.* (1980), a partir de un factor de concentración para cada elemento traza (cociente entre su concentración en los suelos contaminados y el correspondiente valor de fondo: en este caso, valores de suelos no contaminados de la cuenca del Guadamar, Cabrera *et al.*, 1999). Para cada suelo, el valor PLI sería la raíz n-sima del producto de los factores de concentración obtenidos para los elementos considerados.

Tratamiento estadístico de los resultados

En este estudio se han comparado, para cada especie y suelo, las plantas tratadas con la enmienda líquida y con agua (crecimiento, nutrientes, elementos traza).

Tabla 3. Análisis de nutrientes (g kg⁻¹) y elementos traza (mg kg⁻¹) de las muestras de referencia (BCR) CRM 279, CRM 281 y BCR 62. Valores certificados y experimentales (valores medios ± 95% del intervalo de confianza de la media, materia seca). Los valores entre paréntesis son indicativos (no certificados). Los valores experimentales fueron calculados para N = 6 (lechuga de mar), N = 5 (ryegrass) y N = 5 (hojas de olivo)

Elemento	CRM 279 (lechuga de mar)		CRM 281 (ryegrass)		BCR 62 (hojas de olivo)	
	Certificado	Experimental	Certificado	Experimental	Certificado	Experimental
N	(2,05 ± 0,04)	1,70 ± 0,07	(3,32 ± 0,05)	3,17 ± 0,13	—	—
P	(1,80 ± 0,04)	1,50 ± 0,08	(2,30 ± 0,05)	2,15 ± 0,08	—	—
K	(13,9 ± 0,9)	13,0 ± 1,5	(35,2 ± 2,7)	31,6 ± 2,2	—	—
Ca	(27,4 ± 1,1)	30,8 ± 4,1	(7,20 ± 0,09)	6,75 ± 0,13	—	—
Mg	(14,4 ± 0,8)	14,1 ± 1,2	(1,66 ± 0,02)	1,59 ± 0,02	—	—
As	3,09 ± 0,20	2,69 ± 0,11	0,057 ± 0,004	0,118 ± 0,014	(0,20)	0,16 ± 0,016
Cd	0,274 ± 0,022	0,202 ± 0,007	0,120 ± 0,003	0,117 ± 0,005	0,10 ± 0,02	0,074 ± 0,009
Cu	13,14 ± 0,37	11,63 ± 0,73	9,65 ± 0,38	9,76 ± 0,09	46,6 ± 1,8	44,4 ± 2,5
Fe	(2.300 ± 100)	2.113 ± 72,3	—	—	—	—
Mn	(2.030 ± 31,5)	1.758 ± 64,8	81,6 ± 2,6	76,7 ± 0,4	57,0 ± 2,4	54,9 ± 0,46
Ni	(15,9 ± 0,4)	13,1 ± 0,53	3,0 ± 0,17	2,58 ± 0,15	—	—
Pb	13,48 ± 0,36	12,47 ± 1,09	2,38 ± 0,11	2,29 ± 0,07	25,0 ± 1,5	27,4 ± 1,32
Tl	(0,038 ± 0,005)	0,027 ± 0,005	—	—	(0,03)	0,028 ± 0,002
Zn	51,3 ± 1,2	52,18 ± 3,29	31,5 ± 1,4	32,7 ± 0,2	16,0 ± 0,7	19,1 ± 0,65

La comparación se realizó mediante análisis de la *t* de Student, adoptándose un nivel de significación de $P < 0,05$. Las variables que no presentaron una distribución normal (test de Kolmogorov-Smirnov) fueron transformadas logarítmicamente antes de su tratamiento estadístico. Caso de no satisfacerse el test de Kolmogorov-Smirnov, se utilizó un test no-paramétrico (*U* de Mann-Whitney) para la comparación de medias. Se utilizó el programa estadístico SPSS para Windows [©SPSS Inc. (1989-1999), Chicago, Illinois].

Resultados y Discusión

Contaminación residual de las zonas de estudio

Para este estudio fueron seleccionados suelos de marcado carácter ácido, en el caso del acebuche, y suelos básicamente neutros en el caso de la encina, aunque todos ellos con un contenido muy bajo de carbonatos alcalino-térreos (Tabla 1). De esta forma, se dispuso de diferentes condiciones de pH. En general, la absorción vegetal de elementos traza suele ser mayor en suelos de pH ácido (Kabata-Pendias y Pendias, 1992; Greger, 1999).

De acuerdo con los valores de PLI (Tabla 4), la contaminación residual referida era muy alta, especialmente en los suelos 2 y 5 (valores de PLI > 1 indican contaminación). Respecto a los suelos no afectados de la cuenca (Cabrera *et al.*, 1999), los mayores incrementos de concentración correspondieron, en general, al Pb (17 veces mayor en el suelo 2), As (14 veces mayor en el suelo 2) y Cd (12 veces mayor en el suelo 2),

seguidos por el Cu (8 veces mayor en los suelos 2 y 3) y por el Zn (5 veces mayor en el suelo 5).

En general, las concentraciones de elementos traza de los suelos 2, 3 (acebuche) y 5 (encina) serían potencialmente fitotóxicas, especialmente las del suelo 2, aunque las mayores concentraciones de Pb y Zn potencialmente disponibles (extraíbles con EDTA) correspondieron al suelo 5. Sería en estos dos suelos donde, en principio, la posible acción movilizadora de la enmienda orgánica, de producirse, podría tener peores consecuencias. Las condiciones de menor fitotoxicidad, tanto por las condiciones de pH (Tabla 1), como por el valor del PLI y concentraciones totales y potencialmente disponibles de elementos traza (Tabla 4) corresponderían al suelo 4 (encina).

Concentración de nutrientes y elementos traza en las hojas de acebuche y encina

Nutrientes básicos

En suelos contaminados por elementos traza, tiene especial interés el análisis de nutrientes básicos en los tejidos de la planta, ya que concentraciones elevadas de los primeros pueden interferir negativamente en la absorción y transporte de los segundos (Hagemeyer, 1999; Siedlecka *et al.*, 2001). Sin embargo, las concentraciones de elementos básicos de las hojas de acebuche y encina que crecían en los suelos contaminados fueron en general del mismo orden, o incluso ligeramente superiores, que las registradas en el suelo control (suelo 1), circunstancia lógica en el caso del S, dada la riqueza de

Tabla 4. Concentraciones de S, elementos traza (mg kg⁻¹) y valores de PLI de los suelos seleccionados para este estudio

Suelo	S	As	Cd	Cu	Pb	Zn	Cu-EDTA	Pb-EDTA	Zn-EDTA	PLI
1 (control)	321	20	1,07	45	42	112	9,0	7,0	1,9	—
2 (afectado)	16.400	270	3,91	257	634	364	54	26	12	7,45
3 (afectado)	8.120	174	3,13	236	385	312	51	24	8,9	6,21
4 (afectado)	1.730	61	1,93	79	124	196	25	11	2,5	2,67
5 (afectado)	19.500	249	3,66	151	328	510	54	35	22	6,73
<i>Concentraciones de elementos traza en suelos de la Cuenca del Guadiamar afectados (a) y no afectados (b) por el vertido, y concentraciones consideradas fitotóxicas (c)</i>										
Media ^a	6.635	131	2,99	164	237	440	—	—	—	4,76
Media ^b	(221)	18,9	0,33	30,9	38,2	109	—	—	—	—
Intervalo ^b	(118-325)	8,37-38,5	0,12-1,06	12,3-85,0	19,5-86,3	53,9-271	—	—	—	—
Valores fitotóxicos ^c	—	20	3-8	60-125	100-400	70-400	—	—	—	—

a: valores obtenidos en un muestreo realizado a lo largo del corredor verde del Guadiamar sobre 35 suelos afectados por el vertido. b: valores medios e intervalos de suelos no contaminados de la Cuenca del Guadiamar, según Cabrera *et al.* (1999) (valores de S según Madejón, 2004). c: concentraciones fitotóxicas según Ross (1994).

los lodos piríticos en este elemento (hasta 40%, Grimalt *et al.*, 1999). Aun así, las concentraciones de S nunca resultaron excesivas para las plantas, ni significativas las diferencias entre los tratamientos con agua y enmienda fúlvica (Fig. 1). En general, las concentraciones de nutrientes básicos tendieron a ser algo mayores en las hojas de acebuche que en las de encina, salvo en el caso del Mg (y S en el suelo 5) (Fig. 1).

Respecto al tratamiento con agua, la enmienda orgánica aumentó significativamente las concentraciones de N de los acebuches de los suelos 1 y 2, no siendo significativo el aumento registrado en el suelo 3. En la encina sólo se produjeron ligeros aumentos, no significativos, en los suelos 1 y 5. También se observaron ligeros aumentos de P en las hojas de ambas especies, derivados de la aplicación de la enmienda, no significativos y más bajos en el acebuche que los experimentados por el N (Fig. 1).

Más interesantes resultaron los resultados obtenidos para Ca y Mg. En general, el riego con la enmienda condujo a concentraciones de Ca algo más bajas que las obtenidas con el riego con agua, aunque la diferencia sólo resultó significativa para la encina en el suelo 4 (Fig. 1). En este suelo, también se obtuvo una concentración más baja de Mg, aunque este elemento no mostró un comportamiento definido. En los suelos

2 y 3 (acebuche) y 1 y 5 (encina), las concentraciones de Mg tendieron a ser algo mayores bajo el riego con la enmienda (Fig. 1).

En general, los resultados obtenidos para los macronutrientes fueron muy esperanzadores. Excepto en el caso del Ca, la enmienda orgánica ocasionó ligeros aumentos de concentración en la mayoría de los casos (se supone que podrían haber sido mayores bajo aportaciones más intensas). Estos resultados coinciden básicamente con los recogidos por la literatura para la acción de las sustancias húmicas: aumento frecuente en las concentraciones de N, escasas variaciones de las concentraciones de P, K, Ca y Mg, o incluso descensos en las concentraciones de Ca (Chen y Aviad, 1990).

Habría que estudiar en detalle la respuesta obtenida para el Ca. Como es sabido, el Ca ejerce una acción protectora en plantas bajo condiciones de estrés, por lo que no serían aconsejables descensos muy acusados de concentración en los tejidos de la planta. Ahora bien, en el caso del acebuche, los descensos ocasionados por la enmienda fueron algo menores en los suelos contaminados que en el suelo control, lo cual resulta esperanzador. Sin embargo, este patrón no se observó en la encina, por lo que conviene seguir estudiando este aspecto en un número mayor de especies y dosis más altas de enmiendas fúlvicas.

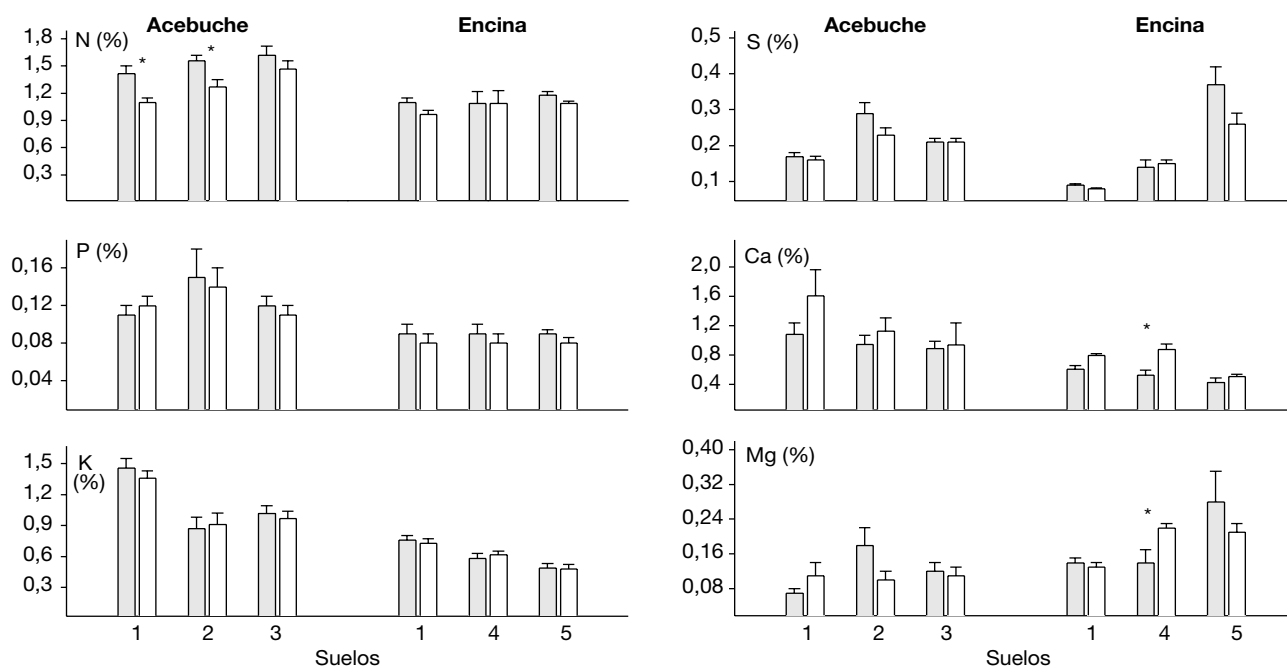


Figura 1. Concentración de macronutrientes en hojas de acebuche y encina en función del tratamiento aplicado: riego con enmienda orgánica rica en ácidos fúlvicos (barras grises) y riego con agua (barras blancas). Valores medios \pm error estándar. Diferencias significativas entre tratamientos se indican mediante un asterisco ($P < 0,05$).

Elementos traza

El estudio de los elementos traza tenía especial interés por las razones expuestas con anterioridad. Para estos elementos, la respuesta vegetal ante la presencia de sustancias húmicas es muy compleja y no siempre coincidente, pues aunque con frecuencia se han observado aumentos en su absorción, también se han registrado comportamientos opuestos. El mecanismo de absorción depende, entre otros factores, de la especie y edad de la planta, pH, concentración de sustancias húmicas, concentración de elementos traza y constante de estabilidad del complejo organo-metálico (Baldock and Nelson, 2000).

Bajo nuestras condiciones experimentales de elevada concentración de elementos traza (especialmente en los suelos 2, 3 y 5) y dosis moderadas de enmienda (además de un pH ácido en los suelos 2 y 3) cabría esperar que la absorción de elementos traza hubiese sido potenciada por la enmienda, especialmente en el caso del acebuche (suelos 2 y 3). Sin embargo, los resultados obtenidos han sido muy esperanzadores, dado que las concentraciones de elementos traza fueron, en general, muy moderadas en las hojas de ambas especies (Fig. 2).

Las concentraciones de Cu tendieron a ser del mismo orden, prácticamente, en los suelos contaminados

y en el suelo control. Sólo en el suelo 5, las concentraciones de Cu de la encina tendían a ser ligeramente superiores a las obtenidas en el suelo control, aunque siempre se mantuvieron dentro del intervalo de 3-20 mg kg⁻¹, considerado normal en plantas superiores (Chaney, 1989) (Fig. 2).

En general, la vegetación no respondió a la elevada concentración de Cu de los suelos afectados (Tabla 4), aspecto puesto de manifiesto por Madejón *et al.* (2002) para gramíneas autóctonas, girasol (Madejón *et al.*, 2003) y álamo blanco (Madejón, 2003, 2004). Las plantas suelen acumular importantes cantidades de Cu en sus raíces, impidiendo su transporte masivo a la parte aérea, donde podría ser más nocivo. Además, su absorción puede verse inhibida por altas concentraciones de Zn en el medio (Kabata Pendias y Pendias, 1992), que podría ser nuestro caso.

La enmienda aumentó las concentraciones de Cu del acebuche, y de la encina en el suelo 5, respecto al tratamiento con agua, pero nunca hasta niveles que pudieran considerarse excesivos (muy por debajo del intervalo de fitotoxicidad: 25-40 mg kg⁻¹) y sin que las diferencias resultaran significativas.

Las concentraciones de Zn (elemento, como el Cu, necesario para las plantas) también tendieron a ser más altas en las plantas de los suelos afectados que en las

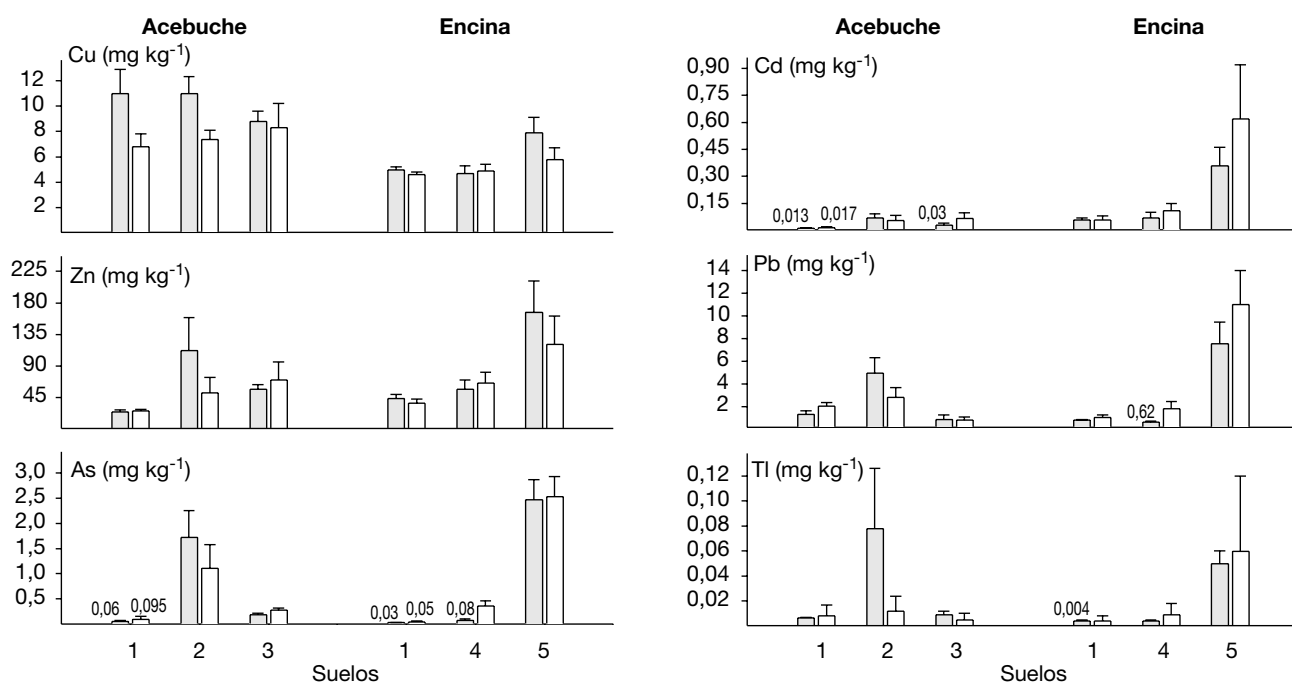


Figura 2. Concentración de elementos traza en hojas de acebuche y encina en función del tratamiento aplicado: riego con enmienda orgánica rica en ácidos fúlvicos (barras grises) y riego con agua (barras blancas). Valores medios \pm error estándar.

del suelo control, especialmente en los suelos 2 (acebuche) y 5 (encina), con mayores valores de PLI (Tabla 4). Sólo en estos suelos se llegaron a alcanzar concentraciones ligeramente superiores al intervalo considerado normal en plantas superiores, 15-150 mg kg⁻¹, aunque muy por debajo del intervalo de fitotoxicidad (500-1.500 mg kg⁻¹). En estos suelos, las concentraciones más altas correspondieron al tratamiento con la enmienda, aunque las diferencias respecto al tratamiento con agua no resultaron significativas (Fig. 2).

De los elementos potencialmente más tóxicos, el As fue uno de los que mayor alarma social causó, debido a su reconocida toxicidad. Sin embargo, incluso en los casos de mayor acumulación, las concentraciones alcanzadas estuvieron por debajo del límite de fitotoxicidad de 3-10 mg kg⁻¹ para plantas superiores (Chaney, 1989) (Fig. 2).

En el caso del acebuche, las concentraciones más altas se registraron en el suelo 2, debido quizás a su mayor nivel de contaminación (PLI de 7,45, Tabla 4) y a que las plantas eran más jóvenes (reforestación de 2 años). En este suelo, la enmienda ocasionó niveles de As ligeramente superiores a los obtenidos con agua, aunque la diferencia no fue significativa (Fig. 2). En el suelo 3, también fuertemente contaminado (PLI de 6,21, Tabla 4), las concentraciones de As en planta fueron bajas, aunque más altas que las registradas en el suelo control (unas 3 veces), siendo similares en este caso los niveles conseguidos con ambos tratamientos (enmienda y agua). Las concentraciones más bajas de As registradas en el suelo 3 pudieron haber estado relacionadas, al menos en parte, con la mayor edad de la reforestación (4 años) (Fig. 2).

En el caso de la encina, las concentraciones de As respondieron, básicamente, al nivel de contaminación de los suelos, esto es, concentraciones bajas (<0,5 mg kg⁻¹) en el suelo 4, menos contaminado (PLI de 2,67) y concentraciones mucho más altas (>2 mg kg⁻¹) en el suelo más contaminado (PLI de 6,73), no influyendo en este caso la edad de la reforestación (ambas con 2 años).

En general, exceptuando los acebuches del suelo 2, las concentraciones de As ocasionadas por el riego con la enmienda fueron similares o ligeramente más bajas que las ocasionadas por el agua, lo que parece poner de manifiesto un escaso poder movilizador de As por parte de la enmienda. Incluso en los acebuches del suelo 2, la diferencia respecto al tratamiento con agua no resultó significativa (Fig. 2).

La enmienda tampoco ocasionó movilización de Cd. Las concentraciones fueron similares o ligeramente

más bajas que las obtenidas con el agua (Fig. 2). En general, las concentraciones de Cd fueron muy bajas, tanto en el acebuche como en la encina, siempre dentro del intervalo de 0,1-1 mg kg⁻¹ considerado normal en plantas superiores, y muy lejos del intervalo fitotóxico de 5-700 mg kg⁻¹ (Chaney, 1989).

Algo similar ocurrió en el caso del Pb, para el que sólo se obtuvieron concentraciones comparativamente altas en los suelos 2 (acebuche) y 5 (encina), especialmente las de la encina, superiores al intervalo normal de plantas, 2-5 mg Kg⁻¹ (Chaney, 1989), aunque muy por debajo del intervalo de fitotoxicidad, 30-300 mg kg⁻¹ (Barceló y Poschenrieder, 1982) (Fig. 2). Como en el caso del Cu, las plantas suelen realizar una acumulación preferencial de Pb en sus raíces, siendo en este caso muy efectivo el sistema de protección definido por Chaney (1989) como «barrera suelo-planta».

Para los objetivos de este trabajo, lo más importante fue comprobar que, como en casos anteriores, la enmienda líquida no ocasionó concentraciones altas de Pb en ninguna de las dos especies, a pesar de su elevada concentración en los suelos (Tabla 4). Hay que tener en cuenta que los ácidos fúlvicos pueden formar complejos con el Pb poco disponibles para la planta (Greger, 1999).

Las concentraciones de Tl en las plantas de los suelos afectados también resultaron bajas en general, especialmente en los suelos 3 (acebuches de más edad) y 4 (encina). En el suelo 2 (el más contaminado de los estudiados), la enmienda orgánica ocasionó concentraciones comparativamente altas de Tl, aunque la diferencia respecto al tratamiento con agua no resultó significativa. En el suelo 5 (encina) también se obtuvieron concentraciones relativamente altas de Tl, pero similares con ambos tratamientos, circunstancia que también se produjo en los suelos 1, 3 y 4. Por consiguiente, salvo la excepción puntual del suelo 2, los resultados obtenidos parecen indicar que la enmienda no potenció la absorción de Tl por parte de las plantas estudiadas.

A pesar de la elevada concentración de Tl en los lodos (hasta 60 mg kg⁻¹, Cabrera *et al.*, 1999), y de ser éste un elemento que las plantas toman con facilidad (cuando está disponible algunas plantas pueden alcanzar concentraciones de hasta 100 mg kg⁻¹), la mayoría de las plantas de los suelos afectados por el vertido presentaron concentraciones bajas de Tl (<0,5 mg kg⁻¹, Madejón, 2004). Sólo en casos puntuales se han llegado a detectar concentraciones altas; por ejemplo, hasta 10 mg kg⁻¹ en cultivos de *Brassica*, Soriano y Fereres (2003), establecidos en los suelos afectados con fines experimentales. En las flores de una crucífera espontá-

nea de la zona, *Hirschfeldia incana* (L.) Lagr. Foss., hemos registrado concentraciones de $TI > 50 \text{ mg kg}^{-1}$, aspecto en estudio por su incidencia potencial sobre la red trófica (Murillo *et al.*, en preparación). Las flores de esta planta son consumidas por numerosos animales.

Pero en general, la baja absorción vegetal de TI debe estar relacionada con la baja movilidad del elemento en los lodos y suelos afectados (Vidal *et al.*, 1999). Las concentraciones medias del acebuche y la encina (como las de la mayoría de las plantas establecidas en las reforestaciones del corredor, datos no presentados) no fueron más allá de $0,08 \text{ mg kg}^{-1}$ (Fig. 2), muy próximas al intervalo de $0,02\text{-}0,04 \text{ mg kg}^{-1}$ frecuente en cultivos procedentes de suelos no contaminados (Adriano, 2001).

Crecimiento y niveles de clorofila

Los resultados de crecimiento y niveles de clorofila obtenidos demostraron, especialmente en el caso del acebuche, que las concentraciones de elementos traza en los tejidos de las hojas de ambas especies (principales órganos fotosintéticos) no resultaron tóxicas.

Los efectos favorables de las sustancias húmicas (ácidos húmicos y fúlvicos) sobre el crecimiento vegetal incluyen, entre otros efectos, (i) mejor crecimiento de tallos y raíces, (ii) aumento de la elongación radical, del número de raíces laterales y mayor premura en los procesos de iniciación radical. Estos efectos serían consecuencia de un aumento de la permeabilidad de las membranas celulares, del aumento de los contenidos de clorofila e intensidad de la fotosíntesis y respiración, aumento de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, y potenciación de la actividad enzimática (Chen and Aviad, 1990; Baldock and Nelson, 2000).

En el caso del acebuche se obtuvieron claras mejoras de crecimiento y contenido de clorofila (Tabla 5), especialmente en los suelos contaminados, lo cual resulta muy esperanzador para los objetivos del presente estudio. El aumento relativo de crecimiento (porcentaje) ocasionado por la enmienda en el suelo 2 (plantas más jóvenes) tendió a ser mayor para la altura, y para el diámetro en el suelo 3 (plantas de mayor edad). El aumento en longitud de la rama fue mayor en el suelo 2 que en el suelo 3, aunque la diferencia sólo resultó significativa en este último suelo.

En el caso de la encina los resultados fueron mucho más discretos, puesto que en los suelos contaminados no se registraron aumentos de crecimiento como consecuencia de la aplicación de la enmienda, y sólo se ob-

tuvo un aumento claro, y significativo, del contenido de clorofila en el suelo 4, menos contaminado (Tabla 5).

Es obvio que la encina respondió peor que el acebuche al tratamiento con ácidos fúlvicos. Ello pudo ser debido a que su ritmo de crecimiento sea más lento, y/o a una menor capacidad para superar las condiciones de estrés que implica el trasplante. Sin embargo, para los objetivos del presente trabajo, lo importante ha sido comprobar que la adición de ácidos fúlvicos no aumentó las concentraciones de elementos traza en los tejidos de esta especie hasta el punto de que pudieran haber comprometido seriamente su crecimiento. Sería interesante estudiar este efecto en plantas mayores, y durante más largo tiempo.

Conclusiones

El conjunto de resultados obtenidos demuestra que la adición de una enmienda rica en ácidos fúlvicos a dos especies representativas del bosque mediterráneo, acebuche y encina, no afectó, básicamente, a su equilibrio nutricional, ni aumentó las concentraciones de elementos traza potencialmente fitotóxicos de forma que pudieran haber comprometido el crecimiento de la planta. Como es sabido, los ácidos fúlvicos benefician claramente el desarrollo de las plantas facilitando la toma de nutrientes, micronutrientes en especial, por lo que también podrían haber facilitado la absorción de elementos traza.

La respuesta del acebuche a la aplicación de la enmienda fue muy positiva, hasta el punto que se registraron mayores aumentos de crecimiento en suelos contaminados por elementos traza que en un suelo no contaminado. La encina, por el contrario, no tuvo una respuesta positiva en cuanto a crecimiento, pero tampoco negativa, aunque sí registró un aumento significativo en sus niveles de clorofila en un suelo comparativamente menos contaminado.

Por consiguiente, y aún admitiendo que este tipo de estudios debería hacerse extensivo a un número mayor de especies, a más largo plazo, y cubriendo un abanico más amplio de condiciones de pH, los primeros resultados obtenidos resultan muy esperanzadores en cuanto a la posibilidad de utilización de productos ricos en ácidos fúlvicos en suelos contaminados por elementos traza, al menos en la dosis aplicada en este estudio.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado dentro del marco del Programa de Investigación del Corredor Verde del

Tabla 5. Contenidos de clorofila (valores SPAD) y crecimiento del acebuche y encina en distintas parcelas del corredor verde en función del tratamiento aplicado. Diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) se indican mediante un asterisco. Valores medios \pm error estándar. Para los tratamientos, 1 y 2 significa antes y después de los mismos, respectivamente ($N = 5$)

Especie	Suelo	Tratamiento	Período	Clorofila	Altura (cm)	Incremento	Diámetro (mm)	Incremento	Rama (cm)	Incremento
Acebuche	1	Enmienda	1		95,7 \pm 5,4		5,09 \pm 0,71		14,6 \pm 2,1	
			2	66,1 \pm 4,4*	105 \pm 5,7	9,3	6,00 \pm 0,58	0,9	26,6 \pm 3,2	12,0*
		Agua	1		91,7 \pm 12,4		5,00 \pm 0,31		10,1 \pm 0,8	
			2	53,0 \pm 1,4	98,8 \pm 8,8	7,1	5,68 \pm 0,40	0,7	22,0 \pm 2,0	11,9
	2	Enmienda	1		64,0 \pm 6,4		6,58 \pm 0,80		11,5 \pm 2,9	
			2	68,3 \pm 4,2*	83,0 \pm 9,3	19	8,71 \pm 1,00	2,1	22,9 \pm 4,6	11,4
		Agua	1		61,4 \pm 8,7		8,07 \pm 0,72		8,7 \pm 1,7	
			2	57,3 \pm 2,1	70,6 \pm 14,6	9,2	9,72 \pm 0,83	1,65	13,0 \pm 2,9	4,3
	3	Enmienda	1		106 \pm 14		13,5 \pm 3,7		24,4 \pm 8,4	
			2	73,8 \pm 3,3	130 \pm 40	24	19,8 \pm 4,5	6,3	38,8 \pm 10,9	14,5*
		Agua	1		124 \pm 12		14,6 \pm 3,9		32,7 \pm 19,5	
			2	67,1 \pm 3,6	142 \pm 26	18	15,9 \pm 1,7	1,3	42,0 \pm 28,5	9,3
Encina	1	Enmienda	1		56,6 \pm 3,3		4,09 \pm 0,70		10,3 \pm 0,8	
			2	43,9 \pm 2,5	68,9 \pm 3,9	12*	5,25 \pm 0,69	1,2	19,5 \pm 2,5	9,2*
		Agua	1		54,1 \pm 4,4		3,97 \pm 0,35		12,3 \pm 1,9	
			2	41,2 \pm 2,1	62,9 \pm 2,9	8,8	4,66 \pm 0,36	0,7	20,6 \pm 2,1	8,3
	4	Enmienda	1		45,2 \pm 4,3		2,53 \pm 0,24		6,1 \pm 1,4	
			2	47,2 \pm 1,7*	48,5 \pm 4,9	3,3	2,88 \pm 0,27	0,35	11,7 \pm 2,8	5,6
		Agua	1		43,9 \pm 0,8		2,59 \pm 0,13		13,5 \pm 2,6	
			2	41,0 \pm 1,5	47,7 \pm 3,6	3,8	2,80 \pm 0,23	0,2	19,4 \pm 3,8	5,9
	5	Enmienda	1		35,9 \pm 2,2		3,02 \pm 0,30		6,4 \pm 2,1	
			2	43,0 \pm 1,4*	44,9 \pm 3,7	9,0	3,20 \pm 0,29	0,18	13,2 \pm 3,5	6,8
		Agua	1		38,5 \pm 3,6		3,93 \pm 0,69		7,9 \pm 3,2	
			2	45,7 \pm 1,0	47,3 \pm 4,9	8,8	4,14 \pm 0,68	0,21	14,5 \pm 2,8	6,6

Guadamar (PICOVER) y financiado por la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía. La determinación de elementos traza en tejidos vegetales se realizó en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (Dra. Olga Cazalla). Los autores agradecen a «Chona», P. de los Santos, M.C. Grande y J.M. Alegre la ayuda prestada.

Referencias bibliográficas

- ADRIANO D.C., 2001. Trace Elements in Terrestrial Environment. Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals. Springer, New York, 867 pp.
- ANTUNES M.C., SIMÃO J.E., DUARTE A.C., ESTEBAN M., TAULER R., 2002. Application of multivariate curve resolution to the voltammetric study of the complexation of fulvic acids with cadmium(II) ion. *Anal Chim Acta* 459, 291-304.
- ARENAS J.M., CARRERO G., GALACHE J., MEDIAVILLA C., SILGADO A., VÁZQUEZ E.M., 2001. Actuaciones realizadas tras el accidente de Aznalcóllar. *Boletín Geológico y Minero* 112 (nº especial). Ayora C., Baretino D., Carrera J., Manzano M., Mediavilla C. (eds.). Las aguas y los suelos tras el accidente de Aznalcóllar, 35-56.
- BALDOCK J.A., NELSON P.N., 2000. Soil Organic Matter. In: Sumner M.E. (ed.), *Handbook of Soil Science*, CRC Press, Boca Raton, B25-B84.
- BARCELÓ J., POSCHENRIEDER CH., 1992. Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. *Suelo y Planta* 2, 345-361.
- C.M.A. (Consejería de Medio Ambiente), 2003. Corredor Verde del Guadamar. 1998-2003. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla. 80 pp.
- C.M.A. (Consejería de Medio Ambiente), 2001. Corredor Verde del Guadamar. Abril 1998-Abril 2001. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla. 70 pp.
- CABRERA F., CLEMENTE L., DÍAZ-BARRIENTOS E., LÓPEZ R., MURILLO J.M., 1999. Heavy metal pollution of soils affected by the Guadamar toxic flood. *Sci. Total Environ* 242, 117-129.
- CABRERA F., LÓPEZ R., MARTINEZ-BORDIÚ A., DUPUY DE LOME E., MURILLO J.M., 1996. Land treatment of olive oil mill wastewater. *Int Biodeter Biodegrad* 38, 215-225.

- CARAVACA F., FIGUEROA D., AZCÓN-AGUILAR C., BAREA J.M., ROLDÁN A., 2003. Medium-term effects of mycorrhizal inoculation and composted municipal waste addition on the establishment of two Mediterranean shrub species under semiarid field conditions. *Agric Ecosyst Environ* 97, 95-105.
- CHANEY R.L., 1989. Toxic element accumulation in soils and crops: protecting soil fertility and agricultural food-chains. In: Bar-Yosef B., Barrow N.J., Goldshmid J. (eds.), *Inorganic Contaminants in the Vadose Zone*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 140-158.
- CHEN Y., AVIAD T., 1990. Effects of humic substances on plant growth. In: MacCarthy P., Clapp C.E., Malcolm R.L., Bloom, P.R. (eds.), *Humic Substances in Soil and Crop Sciences: Selected Readings*. ASA, Inc., SSSA of America, madison, Wisconsin, pp. 161-186.
- CLAPP C.E., CHEN Y., HAYES M. H.B., CLINE V.W., PALAZZO A.J., MOLINA J.A.E., WHITE D.B., BAKER J.M., 2002. Humic substances for enhancing plant growth. *Proceedings of the 20th Anniversary Conference of the Int. Humic Substances Society: Humic substances: nature's most versatile materials*. Boston, Massachusetts, pp. 328-329.
- COLINET E., GRIEPINK B., MUNTAU H., 1982. The certification of the contents of cadmium, copper, manganese, mercury, lead and zinc in two plant materials of aquatic origin (BCR numbers 60 and 61) and in olives leaves (BCR number 62). Report EUR 8119 EN., Luxembourg.
- COX D., BEZDICEK K., FAUCI M., 2001. Effects of compost, coal ash, and straw amendments on restoring the quality of eroded Palouse soil. *Biol Fertil Soils* 33, 365-372.
- GREGER M., 1999. Metal availability and bioconcentration in plants. En: Prasad M.N.V., Hagemeyer J. (eds.), *Heavy Metals Stress in Plants. From Molecules to Ecosystems*. Berlin, Springer-Verlag, pp. 1-27.
- GRIEPINK B., MUNTAU H., 1987. The certification of the contents (mass fractions) of As, B, Cd, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se and Zn in rye grass, CRM 281. Report no. EUR 11839 EN., Luxembourg.
- GRIEPINK B., MUNTAU H., 1988. The certification of the contents (mass fractions) of arsenic, cadmium, copper, lead, selenium and zinc in a sea lettuce (*Ulva lactuca*), CRM No. 279. Report no. 11185 EN., Luxembourg.
- GRIMALT J.O., FERRER M., MACPHERSON E., 1999. The mine tailing accident in Aznalcollar. *Sci Total Environ* 242, 3-11.
- HAGEMEYER J., 1999. Ecophysiology of plant growth under heavy metal stress. En: Prasad M.N.V., Hagemeyer J. (eds.), *Heavy Metals Stress in Plants. From Molecules to Ecosystems*. Berlin, Springer-Verlag, pp. 157-181.
- KABATA-PENDIAS A., PENDIAS H., 1992. *Trace Elements in Soils and Plants*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 365 pp.
- MADEJÓN E. 1996. Aprovechamiento Agronómico de Composts de Vinaza: Efectos en Suelos, Cultivos y Aguas de Drenaje. Tesis Doctoral. Univ. de Sevilla, Sevilla.
- MADEJÓN P., 2003. Elementos traza y nutrientes en álamo blanco tras el vertido tóxico de las minas de Aznalcóllar. *Invest Agrar: Sist Recur For* 12, 19-32.
- MADEJÓN P., 2004. Elementos Traza y Nutrientes en Plantas y Suelos Afectados por el Vertido Minero de Aznalcóllar. Tesis Doctoral. Univ. de Sevilla. Sevilla.
- MADEJÓN P., MURILLO J.M., MARAÑÓN T., CABREIRA F., LÓPEZ R., 2002. Bioaccumulation of As, Cd, Cu, Fe and Pb in wild grasses affected by the Aznalcóllar mine spill (SW Spain). *Sci Total Environ* 290, 105-120.
- MADEJÓN P., MURILLO J.M., MARAÑÓN T., CABREIRA F., SORIANO M.A., 2003. Trace element and nutrient accumulation in sunflower plants two years after the Aznalcóllar mine spill. *Sci Total Environ* 307, 239-257.
- MARTÍN-OLMEDO P., CABRERA F., LÓPEZ R., MURILLO J.M., 1995. Residual effect of composted olive oil mill sludge on plant growth. *Fresenius Envir Bull* 4, 221-226.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN DE ESPAÑA, 1986. *Métodos oficiales de Análisis*. Tomo III. Secretaría general Técnica del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid. 532 pp.
- MURILLO J.M., CABRERA F., LÓPEZ R., 1993. Effect of beet vinasse on germination and seedling performance of ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam cv Barwoltra). *J Sci Food Agric* 61, 155-160.
- PLAZA C., SENESI N., POLO A., BRUNETTI G., GARCÍA-GIL J.C., D'ORAZIO V., 2003. Soil fulvic acid properties as a means to assess the use of pig slurry amendment. *Soil Till Res* 74, 179-190.
- PUNSHON T., 2001. Tree crops. In: Prasad M.N.V. (ed.), *Metals in the Environment. Analysis by Biodiversity*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 321-351.
- ROSS S.M., 1994. Sources and forms of potentially toxic metals in soil-plant systems. In: Ross S.M. (ed.), *Toxic Metals in Soil-Plant Systems*. Wiley, Chichester, pp. 3-25.
- SIEDLECKA A., TUKENDORF A., SKÓRZYŃSKA-POLIT, MAKSYMIEC W., WÓJCIK M., BASZYŃSKI T., KRUPA Z., 2001. Angiosperms (Asteraceae, Convolvulaceae, Fabaceae and Poaceae; other than Brassicaceae). En: Prasad M.N.V. (ed.), *Metals in the Environment. Analysis by Biodiversity*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 171-217.
- SORIANO M.A., FERERES E., 2003. Use of crops for in situ phytoremediation of polluted soils following a toxic flood from a mine spill. *Plant and Soil*, 253-264.
- TOMATI U., GALLI E., 1992. The fertilizing value of waste waters from the olive processing industry. In: Kubát J. (ed.), *Humus, its Structure and Role in Agriculture and Environment*. Elsevier, Amsterdam, pp. 117-126.
- TOMLINSON D.L., WILSON J.G., HARRIS C.R., JEFFREY D.W., 1980. Problems in the assessments of heavy metal levels in estuaries and formation of a pollution index. *Helgol Meeresunters* 33, 566-575.
- VIDAL M., LÓPEZ-SÁNCHEZ J.F., SASTRE J., JIMÉNEZ G., DAGNAC T., RUBIO R., RAURET G., 1999. Prediction of the impact of the Aznalcóllar toxic spill on the trace element contamination of agricultural soils. *Sci Total Environ* 242, 131-148.
- WOOD SUPPLY RESEARCH GROUP, 1997. *Short Rotation Forestry handbook*. International Energy Agency, <http://www.abdn.ac.uk/wsrg/index.htm> (Consulta: 30 Julio 2004).